

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
23 juin 2005 (23.06.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/055885 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **A61F 2/28**

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/003126

(22) Date de dépôt international :
6 décembre 2004 (06.12.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0314299 5 décembre 2003 (05.12.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **BIOCO-
RAL, INC.** [US/US]; 9 East Loockerman Street, Dover,
DE 19901 (US).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **LE PE-
TITCORPS, Yann** [FR/FR]; 3 Rue F. Buisson, F-33850
Leognan (FR). **FRICAIN, Jean-Christophe** [FR/FR];
87 Rue François de Sourdis, F-33000 Bordeaux (FR).
SOULLAC, Vincent [FR/FR]; 9 Rue Mondenard,
F-33000 Bordeaux (FR). **LARGETEAU, Alain** [FR/FR];
13 Avenue Saint Hubert, F-33610 Cestas (FR). **SCHMIT-
THAEUSLER, Roland** [FR/FR]; 44 Rue Louis de Funès,
F-78180 Montigny Le Bretonneux (FR).

(74) Mandataires : **HUBERT, Philippe** etc.; Cabinet Beau de
Loménie, 158 Rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07
(FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: CORAL PURIFICATION METHOD AND CORAL THUS OBTAINED

(54) Titre : PROCEDE DE PURIFICATION DU CORAIL, AINSI QUE LE CORAIL OBTENU PAR CE PROCEDE

(57) Abstract: The invention relates to a method of extracting organic substances from coral, consisting in treating the coral with a fluid or a mixture of fluids in the supercritical state, without altering the crystalline structure of said coral, at a temperature of less than 270 °C and at a pressure much greater than the critical pressure of the fluid or mixture of fluids, for example, of the order of at least three times or, preferably, at least five times greater than said critical pressure. The invention also relates to the coral obtained using said method and to bone substitutes produced therefrom.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'extraction de substances organiques présentes dans le corail, qui consiste à traiter le corail par un fluide ou un mélange de fluides à l'état supercritique sans modifier la structure cristalline dudit corail, à une température inférieure à 270°C, et à une pression très supérieure à la pression critique dudit fluide ou mélange de fluides, par exemple de l'ordre d'au moins 3 fois, et de préférence d'au moins 5 fois ladite pression critique. Elle concerne également le corail obtenu par ce procédé ainsi que les substituts osseux fabriqués à partir de ce corail.

WO 2005/055885 A1

Procédé de purification du corail, ainsi que le corail obtenu par ce procédé.

La présente invention concerne un procédé de purification du corail, ainsi que le corail obtenu par ce procédé.

L'invention trouve notamment application dans le domaine médical.

5 Le corail, qui présente une structure poreuse, est composé essentiellement (environ 97 %) de matière minérale, majoritairement de carbonate de calcium, le reste (environ 3 %) étant constitué d'oxydes de magnésium et de fer ainsi que de substances organiques responsables de sa couleur. Sa dureté varie de 2,5 à 3,5 sur l'échelle de Mohs.

10 Le carbonate de calcium constitutif du corail présente une structure cristallographique métastable de type aragonite susceptible de se transformer facilement en calcite, notamment sous l'effet de la température autour de 260°C.

La matière organique du corail contient une matière protéique mais est sensiblement exempte de matière lipidique.

15 Il existe à ce jour plusieurs substituts osseux à base de corail autorisés par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS). Un de ces produits, commercialisé par la Société INOTEB sous la dénomination BIOCORAL®, est obtenu par traitement du corail à la surface de ses pores, ce qui permet d'éliminer une partie des substances organiques mentionnées ci-dessus.

20 Une analyse morphologique plus poussée du corail (microscopie électronique à balayage et thermique couplée à la spectroscopie de masse) montre toutefois que lesdites substances organiques sont présentes non seulement dans les pores du corail, mais également aux joints de grains des particules de carbonate de calcium. Le traitement mis en place pour le produit
25 BIOCORAL®, ne permet pas d'extraire les substances organiques localisées aux joints de grains, qui représentent environ 90 % de la totalité des substances organiques.

Un problème que vise à résoudre la présente invention est donc de disposer de corail sensiblement exempt de matières organiques et en particulier
30 de protéines qui puisse être utilisé pour fabriquer des substituts osseux de qualité comparable à celle des implants synthétiques existants.

Par « corail sensiblement exempt de matières organiques », on entend dans la présente description du corail contenant au moins deux fois moins de substances organiques que le corail non traité.

Un autre problème que vise à résoudre l'invention est de disposer d'un procédé qui permette d'éliminer les substances organiques présentes dans le corail sans modifier la structure cristalline de ce dernier.

Il a maintenant été découvert, et c'est le fondement de l'invention, que le
5 traitement du corail par un fluide en conditions supercritiques, dans un domaine de température et de pression optimisé, permet d'apporter une solution aux problèmes énoncés ci-dessus, qui n'ont pas été résolus par les procédés connus de l'état de la technique.

Ainsi, selon un premier aspect, l'invention a donc pour objet un procédé
10 d'extraction des substances organiques présentes dans le corail, qui consiste à traiter le corail par un fluide ou un mélange de fluides à l'état supercritique sans modifier la structure cristalline dudit corail, à une température inférieure à 270°C, de préférence inférieure ou égale 260°C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250°C, et à une pression très supérieure à la pression critique dudit
15 fluide ou mélange de fluides, par exemple de l'ordre d'au moins 3 fois, et de préférence d'au moins 5 fois ladite pression critique.

L'utilisation d'un fluide à l'état supercritique pour extraire des substances organiques a été décrite dans le document EP 0 603 920. Cependant, ce document concerne uniquement le traitement d'un tissu osseux et utilise le
20 dioxyde de carbone pour extraire les lipides, c'est-à-dire des substances que l'on ne trouve pas dans le corail. Pour extraire les protéines, on fait appel selon ce document antérieur à un traitement complémentaire de nature chimique ou enzymatique à l'aide de composés additionnels tels que détergents ou oxydants, qui seraient susceptibles d'altérer la structure du corail. En outre, selon ce
25 document, le traitement est réalisé à une pression voisine de la pression critique du dioxyde de carbone.

Selon le procédé de l'invention, on utilise donc un fluide dans des conditions dites "supercritiques", c'est-à-dire que le fluide possède les propriétés invasives d'un gaz tout en se comportant comme un liquide. De ce fait, le fluide
30 est capable de diffuser dans la structure poreuse du corail sans aucun problème de mouillabilité, ce qui permet d'optimiser l'extraction des substances organiques et en particulier les protéines (que l'on désignera également par la suite par "matrice organique") présentes dans le corail.

Le fluide ou le mélange de fluides susceptible d'être utilisé dans le procédé
35 de l'invention doit avoir une température critique inférieure à 270°C, de

préférence inférieure ou égale à 260°C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250°C, et permettre la solubilisation des matières organiques.

A titre d'exemple, on peut citer l'éthanol, l'acétone, ou un mélange d'un de ces deux fluides avec du dioxyde de carbone possédant une température critique inférieure à 270°C. Avantageusement, on utilise de l'éthanol du fait de la disponibilité de ce produit et de son caractère peu onéreux et non-toxique. La température critique de l'éthanol est de 240°C et sa pression critique est de 6,12 MPa.

Dans le cas où le fluide est de l'éthanol ou de l'acétone, la température de traitement du corail est avantageusement comprise entre 240 et 260°C.

Dans le cas où l'on utilise un mélange de fluides tel qu'un mélange éthanol-dioxyde de carbone, la température de traitement du corail est avantageusement comprise entre 80 et 100°C.

Le procédé de l'invention est mis en œuvre à une pression suffisante, très supérieure à la pression critique du fluide ou du mélange de fluides utilisé pour éviter la transformation de la structure cristalline du corail. De ce point de vue, la pression critique des fluides mentionnés ci-dessus, est facilement accessible.

Dans le cas de l'éthanol ou de l'acétone, la pression de traitement du corail est avantageusement comprise entre 300 et 450 MPa, de préférence entre 350 et 450 MPa.

Dans le cas d'un mélange de fluides tel qu'un mélange éthanol-dioxyde de carbone, la pression de traitement du corail est avantageusement comprise entre 30 et 50 MPa, de préférence de l'ordre de 40 MPa.

La durée du traitement n'est pas critique en soi et varie généralement entre quelques minutes et quelques heures, en fonction du fluide utilisé. Dans le cas de l'éthanol ou de l'acétone, cette durée est avantageusement comprise entre 15 et 240 min, de préférence d'une heure environ.

Etant donné la composition chimique minérale du corail, le fluide ou le mélange de fluides selon l'invention est avantageusement utilisé sans aucun composé additionnel tel qu'un détergent ou un oxydant susceptible d'altérer la structure du corail.

Selon un second aspect, l'invention concerne le corail sensiblement exempt de substances organiques, tel qu'obtenu par le procédé décrit ci-dessus.

Selon un troisième aspect, l'invention concerne les substituts osseux réalisés à partir de corail sensiblement exempt de substances organiques. Ces

substituts osseux peuvent être obtenus par des méthodes bien connues de l'homme du métier.

L'invention va maintenant être illustrée à l'aide des exemples ci-après.

5 **Exemple 1 : Traitement supercritique du corail**

Le corail brut est traité dans un dispositif de génération de haute pression d'eau dans une enceinte ayant un volume fixé. Celle-ci, réalisée dans un alliage à hautes caractéristiques mécaniques, a une profondeur de 229 mm, un diamètre interne de 55 mm. Elle est fermée par un obturateur en forme de champignon supportant le joint métallique qui assure l'étanchéité par sa déformation. L'étanchéité au démarrage (sans pression dans l'autoclave) est réalisée par la remontée de l'obturateur, à l'aide de 8 vis dans la partie supérieure. La pression appliquée dans l'enceinte par la pompe ou la température va comprimer le joint qui va de lui-même rendre étanche le système.

15 La température est mesurée à l'intérieur de l'enceinte par un thermocouple monté dans la partie haute du réacteur. Il est en contact direct avec le fluide sous pression.

Le corail est placé dans des flacons souples de 20 ml en Téflon PFA (Réf. M77400, Fisher Bioblock Scientific) résistant à des températures avoisinant les 20 300°C et supportant la déformation due à la pression. La pression s'exerçant sur les parois internes et externes du flacon est la même. En effet, le flacon ne contenant pas ou très peu d'air, le liquide présent à l'intérieur du flacon et le liquide transmetteur (eau) sont à la même pression, la paroi est donc comme « invisible » et ne subit qu'une légère déformation due à la compressibilité de 25 l'eau. Le traitement s'effectue en présence d'éthanol comme fluide "supercritique", à une température de 240 à 260°C, de préférence de l'ordre de 250°C sous une pression de 300 à 400 MPa, de préférence de l'ordre de 350 MPa, pendant 15 à 240 min, de préférence d'environ 1 h.

30 **Exemple 2 : Détermination de la quantité de substances organiques résiduelles dans le corail traité**

L'échantillon obtenu à l'exemple 1 est broyé au mortier et pesé (masse MB - matière brute - d'environ 3 g). On prélève 3 g de la poudre obtenue que l'on dissout dans 135 ml d'HCl 0,1 N, sous agitation pendant 1 h. La solution 35 ainsi obtenue est dialysée sur une membrane de poids moléculaire 12 000 à

16 000 (référence MCWO), puis congelée à -80°C et lyophilisée. Le lyophilisat est à son tour pesé (masse MO – matière organique – d'environ 3 g).

A titre de comparaison, la même expérience est réalisée sur un échantillon de corail brut (aragonite) et sur un échantillon de produit BIOCORAL®.

5 La figure 1 représente le rapport MO/MB pour chacun des trois échantillons. On peut constater que le traitement "supercritique" selon l'invention permet d'obtenir du corail contenant environ deux fois moins de substances organiques que le produit BIOCORAL®.

10 **Exemple 3 : Détermination de la quantité de protéines résiduelles dans le corail traité**

1/ Préparation de la solution de travail et des échantillons :

- On mélange 50 volumes de la solution A avec 1 volume de la solution B. La solution de travail est légèrement trouble au début, puis
15 rapidement elle s'éclaircit avec agitation douce au vortex. Sa couleur est vert opalescent.
- On broye les échantillons au mortier et on pèse la poudre obtenue.
- On dissout 1 g de poudre dans 45 ml d'HCL à 0,6 N pendant 1 heure sous agitation.

20 *2/ Procédure pour la détermination :*

- On dose la fraction soluble dans l'eau : 1,2 mg de matière organique sont solubilisés dans 75 μL d'eau.
- On solubilise le culot restant après centrifugation dans 75 μL de NaOH à 0,3 N.
- 25 - On prélève 25 μL de chaque standard (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de chaque échantillon (préparés de la même manière que les échantillons à doser) et on les distribue dans les puits d'une plaque de 96 puits.
- On couvre la plaque et on incube pendant 30 min. à 37°C .
- 30 - On lit la densité optique à 562 nm une fois que la plaque est refroidie à température ambiante.

A titre de comparaison, la même expérience est réalisée sur un échantillon de corail brut (aragonite) et sur un échantillon de produit BIOCORAL®.

35 La figure 2 représente le rapport protéines/MB pour chacun des trois échantillons. On peut constater que le traitement "supercritique" selon l'invention

permet d'obtenir du corail duquel environ deux fois plus de protéines ont été extraites, comparé au produit BIOCORAL®.

Exemple 4 : Mise en évidence de la prolifération cellulaire de cellules osseuses sur le corail traité

On découpe des cylindres ($\varnothing=12$ mm) en disque d'un mm d'épaisseur à l'aide d'une scie diamantée, puis on les stérilise par chaleur sèche à 100°C pendant 1h30 (3 cycles). Les disques sont déposés sur un lit d'aragose 0,1 % dans des boîtes de culture (NUNC ; 24 puits, 2 cm²). La suspension cellulaire est déposée sur chaque disque à raison de 20 000 cellules MG63/cm² (1,13 cm² x 2 car porosité – 22 600 cellules soit environ 50 000 cellules par échantillon), dans un volume de 100 µL de milieu de culture complet (IMDM : Iscove's Modified Dubelcco's Medium, 10 % SVF – sérum de veau foetal). Après 30 minutes pour laisser les cellules adhérer, on complète avec 1 ml de milieu. Le milieu est changé tous les deux jours.

On enlève le milieu de culture complet et on rince avec du milieu seul. On prive les cellules pendant 17 heures (milieu seul + 10 % de SVF, thymidine tritiée, 10 µCi/ml (Réf : TRK 758 AMERSHAM), soit 10 µL de ³HT/Volume de milieu complet). On élimine le surnageant (à conserver pour élimination ultérieure), puis on enlève le matériau de l'agarose et on le transfère dans un puits en plastique. On rince deux fois avec du PBS 1X (ou du Hank's 1X), puis on fixe les cellules avec du méthanol froid 100 %, pendant 10 min à 4°C. On rince deux fois avec du PBS 1X (ou du Hank's 1X), et on précipite avec du TCA froid 5 % pendant 20 minute à 4°C. On élimine le surnageant, et on rince quatre fois avec du PBS 1X (ou du Hank's 1X).

On incube dans NaOH 0,3 N pendant 2 heures à température ambiante (dissolution de la couche cellulaire), sans dépasser 300 à 500 µL de NaOH. On récupère la solution dans un tube à scintillation auquel on rajoute 5 ml de liquide scintillant, et on détermine la radioactivité de la solution et du matériau à l'aide d'un compteur β (radioactivité négligeable).

A titre de comparaison, la même expérience est réalisée sur un échantillon de corail brut (aragonite) et sur un échantillon de produit BIOCORAL®.

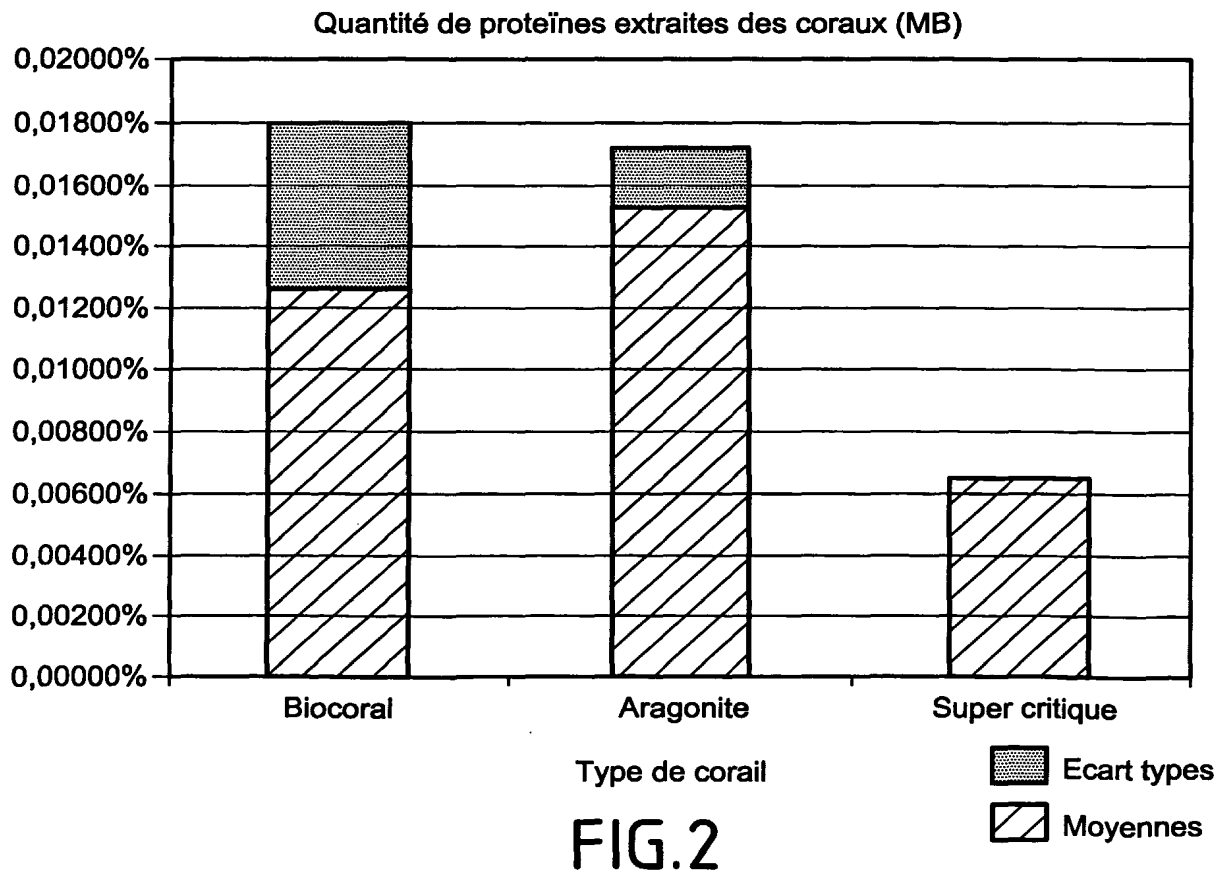
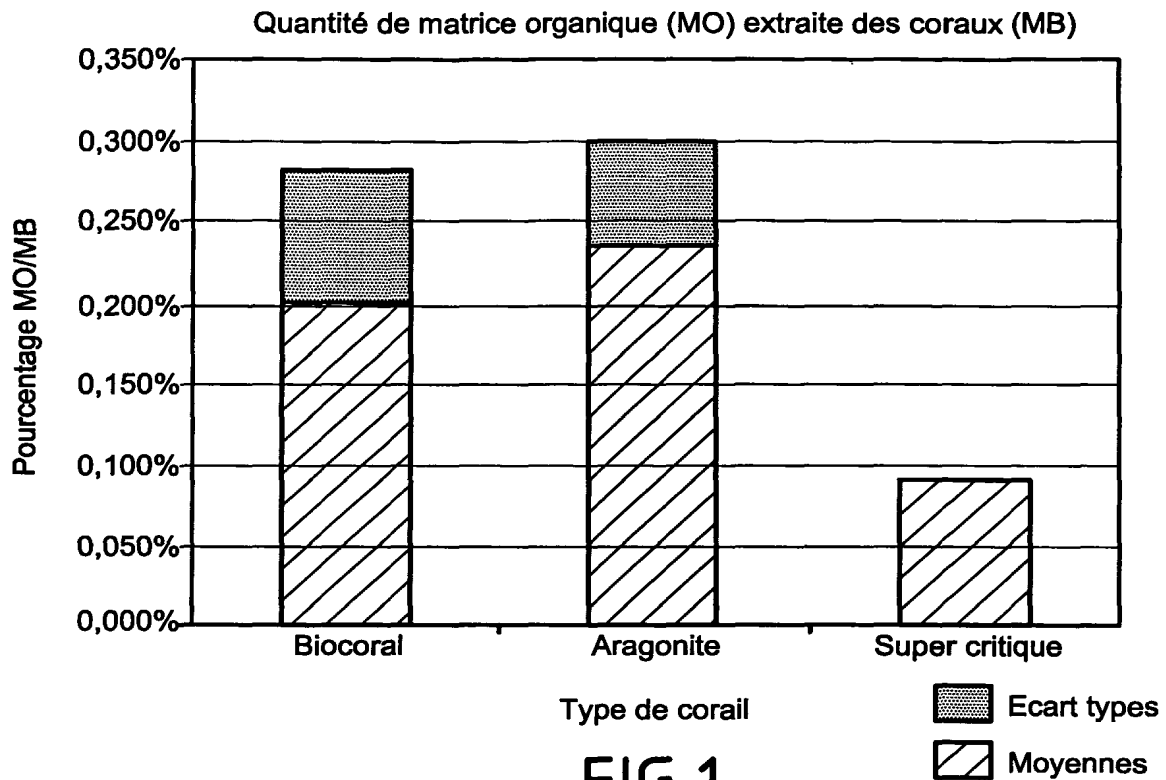
Les résultats sont présentés sur la Figure 3. On peut constater que la prolifération cellulaire des cellules MG63 sur le corail traité selon l'invention, est identique à celle observée sur le produit BIOCORAL®.

L'ensemble de ces résultats suggère que le corail traité selon la présente invention peut être utilisé dans la fabrication de substituts osseux.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'extraction de substances organiques présentes dans le corail, qui consiste à traiter le corail par un fluide ou un mélange de fluides à l'état
5 supercritique sans modifier la structure cristalline dudit corail, à une température inférieure à 270°C, de préférence inférieure ou égale à 260°C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250°C et à une pression très supérieure à la pression critique dudit fluide ou mélange de fluides, par exemple de l'ordre d'au moins 3 fois, et de préférence d'au moins 5 fois ladite pression critique.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ledit fluide est choisi parmi l'éthanol et l'acétone, et le mélange de fluides est choisi parmi les mélanges éthanol-dioxyde de carbone et acétone-dioxyde de carbone dont la température critique est inférieure à 270°C, de préférence inférieure ou égale à 260°C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250°C.
- 15 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel ledit fluide est l'éthanol.
4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel la pression de traitement du corail est comprise entre 300 et 450 MPa, de préférence entre 350 et 400 MPa.
- 20 5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel la température de traitement du corail est comprise entre 240 et 260°C, de préférence de l'ordre de 250°C et de le temps de traitement du corail est compris entre 15 et 240 min, de préférence de l'ordre de 1 h.
6. Procédé selon la revendication 2, dans lequel le mélange de fluides est
25 un mélange éthanol-dioxyde de carbone, la pression de traitement du corail est comprise entre 30 et 50 MPa, de préférence de l'ordre de 40 MPa.
7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel la température de traitement du corail est de l'ordre de 80 à 100°C.
8. Corail obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 7.
- 30 9. Substitut osseux fabriqué à partir du corail selon la revendication 8.

1/2



2/2

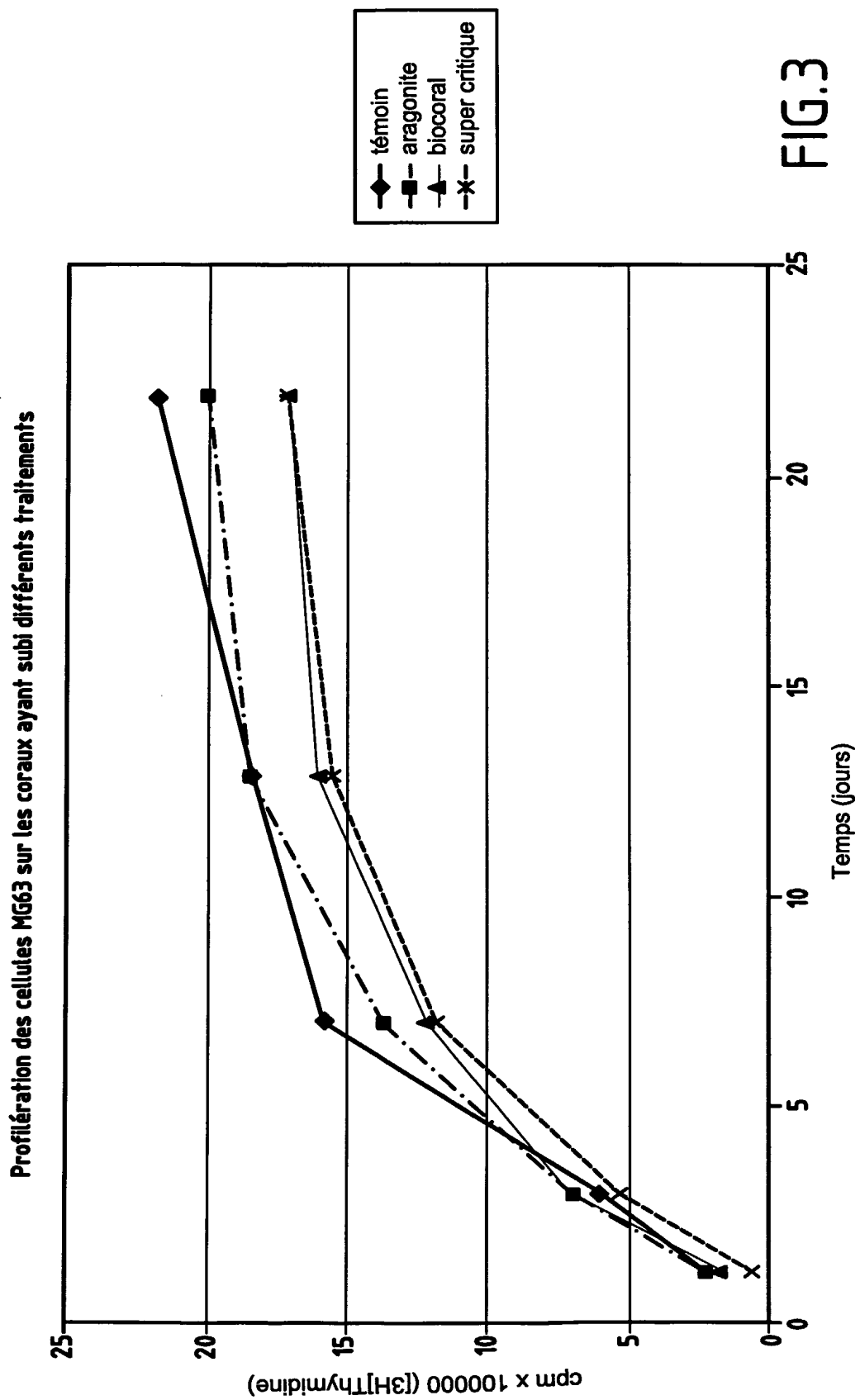


FIG.3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte al Application No
PCT/FR2004/003126

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61F2/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61L A61F		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 603 920 A (BIOLAND SARL) 29 June 1994 (1994-06-29) cited in the application page 3, line 43 - line 55; claims -----	1-9
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 199921 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D22, AN 1999-244730 XP002291521 & CN 1 203 189 A (UNIV ZHONGSHAN OPHTHALMOLOGY CENT ZHONGS) 30 December 1998 (1998-12-30) abstract -----	1-9
A	US 5 723 012 A (BONEL GILBERT ET AL) 3 March 1998 (1998-03-03) column 3, line 38 - line 67; claims ----- -/--	1-9
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
° Special categories of cited documents :		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*G* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">19 April 2005</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">06/05/2005</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">ESPINOSA, M</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte al Application No
PCI/FR2004/003126

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/02200 A (AUSTRALIAN INST MARINE SCIENCE ; VAGO RAZO (IL)) 21 January 1999 (1999-01-21) claims -----	1-9
A	US 6 579 532 B1 (HOWDLE STEVEN M ET AL) 17 June 2003 (2003-06-17) claims; examples 1-5 -----	1-9
A	US 6 414 050 B1 (HOWDLE STEVEN MELVYN ET AL) 2 July 2002 (2002-07-02) claims; examples 1-6 -----	1-9
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 200358 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D22, AN 2003-608624 XP002291522 & CN 1 416 910 A (YIHUAJIAN SCI & TRADE CO LTD BEIJING) 14 May 2003 (2003-05-14) abstract -----	1-9
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 200102 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2001-007912 XP002291523 & CN 1 144 102 A (GUIZHOU PROV BIOLOGICAL RESOURCE SUPERCR) 5 March 1997 (1997-03-05) abstract -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2004/003126

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0603920	A	29-06-1994	FR 2699408 A1 AT 177954 T CA 2110527 A1 CN 1090206 A ,C DE 69324117 D1 DE 69324117 T2 DK 603920 T3 EP 0603920 A1 ES 2130216 T3 GR 3030429 T3 JP 3571362 B2 JP 6218036 A US 6217614 B1 US 5725579 A	24-06-1994 15-04-1999 22-06-1994 03-08-1994 29-04-1999 18-11-1999 11-10-1999 29-06-1994 01-07-1999 30-09-1999 29-09-2004 09-08-1994 17-04-2001 10-03-1998
CN 1203189	A	30-12-1998	NONE	
US 5723012	A	03-03-1998	FR 2735372 A1 AT 214616 T DE 69619893 D1 DE 69619893 T2 DK 748632 T3 EP 0748632 A1 ES 2174035 T3 PT 748632 T US 6217614 B1 US 5725579 A	20-12-1996 15-04-2002 25-04-2002 31-10-2002 15-07-2002 18-12-1996 01-11-2002 30-08-2002 17-04-2001 10-03-1998
WO 9902200	A	21-01-1999	AU 731916 B2 AU 8199098 A WO 9902200 A1 CA 2295636 A1 EP 0994735 A1 JP 2001509422 T NZ 502022 A	05-04-2001 08-02-1999 21-01-1999 21-01-1999 26-04-2000 24-07-2001 22-12-2000
US 6579532	B1	17-06-2003	AU 8671201 A WO 0221222 A1	22-03-2002 14-03-2002
US 6414050	B1	02-07-2002	AU 7344498 A CN 1264309 A ,C EP 0981373 A1 WO 9851347 A1 JP 2002506428 T US 2002155145 A1 ZA 9803923 A	08-12-1998 23-08-2000 01-03-2000 19-11-1998 26-02-2002 24-10-2002 26-02-1999
CN 1416910	A	14-05-2003	NONE	
CN 1144102	A	05-03-1997	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De  internationale No
PCT/FR2004/003126

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61F2/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61L A61F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 603 920 A (BIOLAND SARL) 29 juin 1994 (1994-06-29) cité dans la demande page 3, ligne 43 - ligne 55; revendications	1-9
Y	----- DATABASE WPI Section Ch, Week 199921 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D22, AN 1999-244730 XP002291521 & CN 1 203 189 A (UNIV ZHONGSHAN OPHTHALMOLOGY CENT ZHONGS) 30 décembre 1998 (1998-12-30) abrégé ----- -/--	1-9

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 avril 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/05/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ESPINOSA, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PCT/FR2004/003126

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 723 012 A (BONEL GILBERT ET AL) 3 mars 1998 (1998-03-03) colonne 3, ligne 38 - ligne 67; revendications -----	1-9
A	WO 99/02200 A (AUSTRALIAN INST MARINE SCIENCE ; VAGO RAZO (IL)) 21 janvier 1999 (1999-01-21) revendications -----	1-9
A	US 6 579 532 B1 (HOWDLE STEVEN M ET AL) 17 juin 2003 (2003-06-17) revendications; exemples 1-5 -----	1-9
A	US 6 414 050 B1 (HOWDLE STEVEN MELVYN ET AL) 2 juillet 2002 (2002-07-02) revendications; exemples 1-6 -----	1-9
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 200358 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D22, AN 2003-608624 XP002291522 & CN 1 416 910 A (YIHUAJIAN SCI & TRADE CO LTD BEIJING) 14 mai 2003 (2003-05-14) abrégé -----	1-9
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 200102 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2001-007912 XP002291523 & CN 1 144 102 A (GUIZHOU PROV BIOLOGICAL RESOURCE SUPERCR) 5 mars 1997 (1997-03-05) abrégé -----	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR2004/003126

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0603920	A	29-06-1994	FR 2699408 A1 AT 177954 T CA 2110527 A1 CN 1090206 A ,C DE 69324117 D1 DE 69324117 T2 DK 603920 T3 EP 0603920 A1 ES 2130216 T3 GR 3030429 T3 JP 3571362 B2 JP 6218036 A US 6217614 B1 US 5725579 A	24-06-1994 15-04-1999 22-06-1994 03-08-1994 29-04-1999 18-11-1999 11-10-1999 29-06-1994 01-07-1999 30-09-1999 29-09-2004 09-08-1994 17-04-2001 10-03-1998
CN 1203189	A	30-12-1998	AUCUN	
US 5723012	A	03-03-1998	FR 2735372 A1 AT 214616 T DE 69619893 D1 DE 69619893 T2 DK 748632 T3 EP 0748632 A1 ES 2174035 T3 PT 748632 T US 6217614 B1 US 5725579 A	20-12-1996 15-04-2002 25-04-2002 31-10-2002 15-07-2002 18-12-1996 01-11-2002 30-08-2002 17-04-2001 10-03-1998
WO 9902200	A	21-01-1999	AU 731916 B2 AU 8199098 A WO 9902200 A1 CA 2295636 A1 EP 0994735 A1 JP 2001509422 T NZ 502022 A	05-04-2001 08-02-1999 21-01-1999 21-01-1999 26-04-2000 24-07-2001 22-12-2000
US 6579532	B1	17-06-2003	AU 8671201 A WO 0221222 A1	22-03-2002 14-03-2002
US 6414050	B1	02-07-2002	AU 7344498 A CN 1264309 A ,C EP 0981373 A1 WO 9851347 A1 JP 2002506428 T US 2002155145 A1 ZA 9803923 A	08-12-1998 23-08-2000 01-03-2000 19-11-1998 26-02-2002 24-10-2002 26-02-1999
CN 1416910	A	14-05-2003	AUCUN	
CN 1144102	A	05-03-1997	AUCUN	